

**DÉGRADATION EXPÉRIMENTALE DES COLONIES
DU GENRE *BOTRYOCOCCUS*
DES SCHISTES PÉTROLIFÈRES
DU TERTIAIRE SUPÉRIEUR DE HONGRIE**

M. KEDVES

(Reçu le 25 Mars 1985)

Résumé

Nous avons mené des recherches expérimentales sur les colonies de *Botryococcus braunii* KÜTZ. des schistes pétrolifères de Pula (Hongrie). Une enzyme de *Helix* et du Mercapto-Ethanol ont été utilisés comme agents de dissolution pour attaquer partiellement et avec des intensités variables la paroi résistante des colonies de *Botryococcus* fossiles. Les observations ont été faites au MePh (microscope photonique) et au MeT (microscope électronique à transmission). Le MeT a permis de mettre évidence des unités globulaires de macromolécules ressemblant aux polymères de sporopollénine. L'arrangement de ces unités peut être en forme de filaments. L'application de cette méthode à des microfossiles végétales depuis le Précambrien jusqu'au sommet du Tertiaire permettra d'établir la phylogénie moléculaire de la paroi des microfossiles végétaux.

Mots clés: Tertiaire supérieur — schistes pétrolifères — *Botryococcus braunii* — dégradation expérimentale — macromolécules.

Introduction

Dans un article précédent (KEDVES 1983), les associations sporo-polliniques et l'étude aux MePh et MeT de *Botryococcus braunii* KÜTZ. des schistes pétrolifères de quelques localités de Hongrie ont été publiées. En ce qui concerne les colonies de *Botryococcus*, nous avons fait remarquer que leur couleur indiquait la présence de carotènes. Il est permis de supposer que ces carotènes ont été polymérisés en biopolymères, semblables à ceux de la sporopollénine. Pour définir la structure moléculaire des biopolymères de la paroi sporo-pollinique, on peut utiliser plusieurs méthodes. Les résultats de SENGUPTA et ROWLEY (1974), de ROWLEY (1975, 1978) et de ROWLEY et al. (1981) obtenus par l'utilisation de solvants et d'autres agents sont à mentionner en premier lieu. Une autre possibilité est la dégradation enzymatique. C'est ELSIK (1966, 1971) qui a fait le point sur les problèmes les plus importants de la dégradation enzymatique des spores et des grains de pollen fossiles. Au cours de nos recherches palynologiques sur les sporomorphes de l'Eocène inférieur de Mississippi (États Unis) nous avons trouvé des exines de *Restioniidites hungaricus* (KDS. 1965) ELSIK 1968, partiellement dégradées. En étudiant la structure fine de ces exines sur les photos au MeT aux grossissements 500000 et 1 million, nous avons montré des unités globulaires de l'exine partiellement dégradées, qui sont probablement des polymères de sporopollénine. Pour obtenir des informations plus précises, nous avons essayé de dégrader la paroi pollinique de façon contrôlée pour mettre en évidence la structure moléculaire. En un premier temps nous avons

utilisé la méthode enzymatique. Cette méthode est largement utilisée dans préparation des protoplastes dans le cadre de recherches génétiques des microorganismes ou des organismes évolués. Les résultats des premières expériences, obtenus sur les grains de pollen du *Corylus avellana* L. actuel, concernant des problèmes généraux de ce type sont en cours de publication. Dans ce travail les premiers résultats sur la dégradation expérimentale de microrestes fossiles sont présentés.

Matériel et méthode

Les échantillons du sondage P-1928 de Pula (Hongrie) sont les mieux adaptés à ce genre de recherche. La préparation des échantillons a été faite, comme suit; attaque à l'acide nitrique, suivie d'un lavage; séparation par ZnCl_2 , lavage; HF, lavage. Le résidu organique, et principalement des colonies de *Botryococcus*, été séché. Les traitements ont été fait sur du matériel séché. Les variantes des conditions d'expérimentation ont été combinées comme ci-dessous:

- B.1.1. 20 mg de matériel séché de *Botryococcus* + 2 ml d'enzyme de *Helix* à 2% + 1 ml de Mercapto-Ethanol; température: 30 °C; durée de l'expérience: 2 heures et 30 minutes.
- B.1.2. la même composition, sauf la durée de l'expérience: 5 heures.
- B.2.1. 20 mg de matériel séché de *Botryococcus* + 2 ml d'enzyme de *Helix* à 2% + 20 µl de Mercapto-Ethanol; température: 30 °C; durée de l'expérience: 2 heures et 30 minutes.
- B.2.2. la même composition, sauf la durée de l'expérience: 5 heures.
- B.3.1. 20 mg de matériel séché de *Botryococcus* + 2 ml d'enzyme de *Helix* à 2%; température: 30 °C; durée de l'expérience: 2 heures et 30 minutes.
- B.3.2. la même composition, sauf la durée de l'expérience: 5 heures.
- B.4a.1. 20 mg de matériel séché de *Botryococcus* + 1 ml Mercapto-Ethanol + 2 ml d' H_2O distillée, température: 30 °C; durée de l'expérience: 2 heures et 30 minutes.
- B.4a.2. la même composition, sauf la durée de l'expérience: 5 heures.

En fin de traitement, le résidu est lavé plusieurs fois à l'eau distillée. Pour les études au MeT, la post-fixation à l' OsO_4 /eau-distillée a été utilisée pour l'infiltration d'araldite (Durcupan, Fluka). Les lames ont été montées avec de l'araldite pour les observations au MePh. Il faut remarquer que l'araldite convient bien pour conserver les objets microscopiques sous la lamelle. Les photos au MeT ont été prises au Laboratoire de Microscopie Electronique de l'Université J.A. de Szeged, sur un microscope électronique Tesla BS-500 (résolution 6 Å).

Résultats

Au cours et à la fin des traitements les changements de la couleur et de la consistance du matériel sont des signes d'altérations. Les résultats des études au microscope optique ont fourni des indications concernant le degré de dégradation des colonies de *Botryococcus* (Planche I, fig. 1-8, fig.1). Parmi les colonies, il y en a qui, au microscope optique, sont en bon état de conservation (Planche I, fig. 1-3). D'autres sont partiellement (Planche I, fig. 4,5), ou complètement dégradées (Planche I, fig. 7,8). La figure 6 de la Planche I, représente une colonie ou quelques zones sont presque homogénéisées, et d'autres apparemment conservées en état originel. En ce qui concerne les résultats quantitatifs des colonies in vitro dégradées à des degrés différents, nous pouvons faire les remarques suivantes:

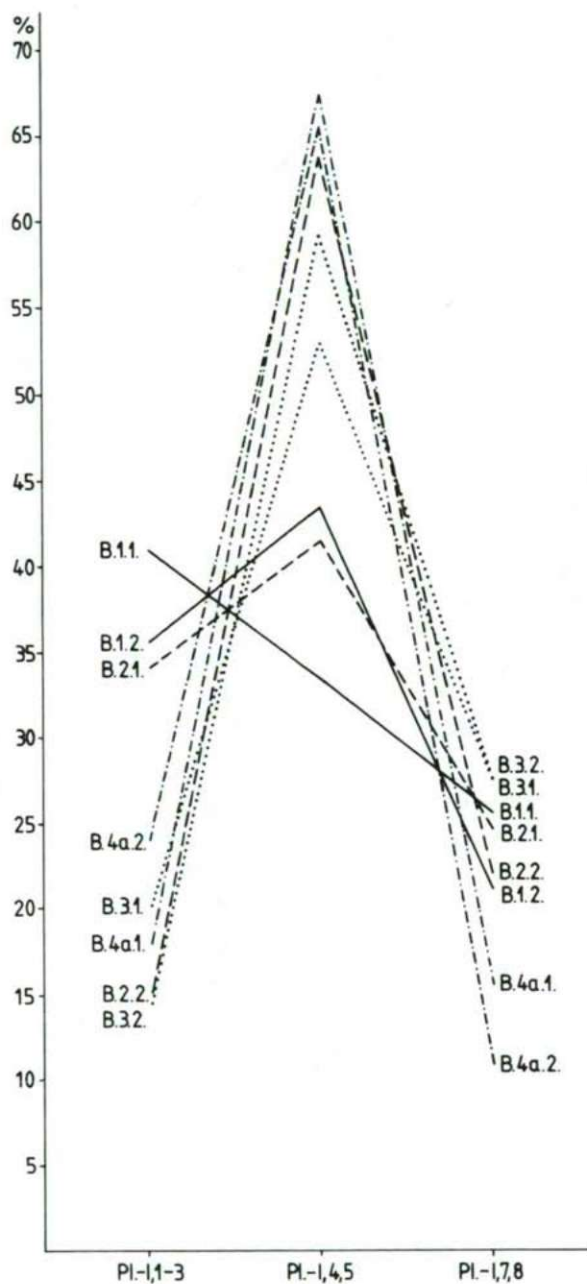


Fig. 1

Pourcentages des colonies de *Botryococcus braunii* KÜTZ. à trois degrés de dégradation suite à des traitements différents. Pl.-I, 1-3 = Planche I, fig. 1-3, Pl.-I, 4,5 = Planche I, fig. 4,5, Pl.-I, fig 7,8 = Planche I, fig. 7,8.

1. La dégradation de la paroi des colonies a eu lieu quel que soit le type de traitement employé. Le Mercapto-Ethanol, sans enzyme, est tout aussi actif pour dégrader les colonies de *Botryococcus*.

2. Selon les diverses variantes de nos expériences, on note des différences. A première vue, il semble que le traitement B.1.1., diffère des autres en laissant intacte la plus grande partie des colonies. A partir de B.1.2. les courbes sont complètement différentes, les maximums de dégradation se trouvent au centre et on peut constater une augmentation graduelle. Les pourcentages de colonies partiellement dégradées après B.2.1. et B.1.2., n'atteignent pas 45%; après B.2.2., B.4a.1., et B.4a.2. ils dépassent 60%. Les maximums de B.3.1. et B.3.2. se situent entre 50% et 60%.

Les résultats au microscope électronique à transmission sont les suivants:

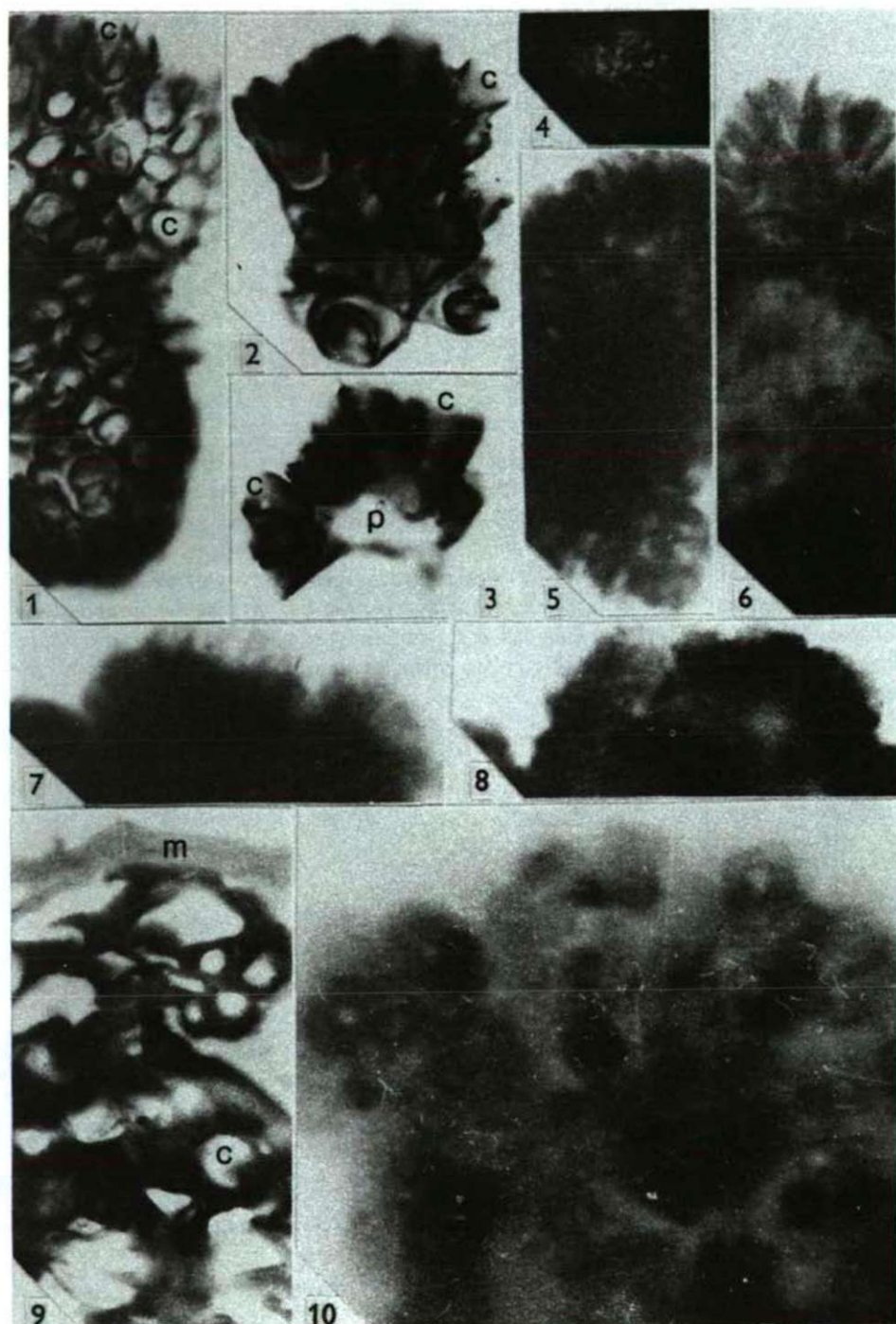
B.1.1. L'ultrastructure originale des colonies qui semblait intacte au microscope photonique peut être observée. Le mucilage lamellaire est ici beaucoup plus visible que chez les exemplaires qui n'ont pas subi de traitement spécifique (KEDVES 1983, planche 1, fig.7). Les unités de polymères ont pu être observées là où la paroi des colonies était localement corrodée. Les signes de début de dégradation sont plus marqués, quand une zone plus ou moins grande située sous la surface a une affinité électronique plus forte que la partie interne. Les colonies attaquées à des degrés divers sont les plus propices à l'étude de la morphologie et de la disposition des unités de polymères. Il y a des éléments sphériques arrangés en filaments ou en réseaux. Les unités sont composées, en général, de cinq sous-unités décrites par ROWLEY (1967) à la base des grandes épines du grain de pollen de *Nuphar luteum*. Selon ROWLEY (1967) il s'agit de „fibrilles tubuleuses”. Dans notre cas, ce ne sont probablement pas des fibrilles, mais la ressemblance entre les photos de ROWLEY (1967) et les nôtres est frappante; nous appellerons ces éléments „unités de ROWLEY” en hommage à Monsieur J. ROWLEY.

Planche I

1-8. Colonies de *Botryococcus braunii* KÜTZ. à divers stades de dégradation au MePh. Le résidu a été monté à l'araldite, après préparation à l' OsO_4 /eau dist. Il faut noter que les pédoncules des colonies ont moins accepté l'osmium que les cupules, x500.

1. Prép. B.1.1.-2; 2.7/116.8
2. Prép. B.3.2.-2; 1.6/109.2
3. Prép. B.4a.1.-1; 11.2/102.5
4. Prép. B.2.1.-2; 7.4/102.6
5. Prép. B.3.1.-1; 20.5/111.2
6. Prép. B.3.1.-1; 7.3/109.2
7. Prép. B.1.2.-2; 12.6/112.2
8. Prép. B.1.1.-2; 7.8/119.4
9. B.1.1., MeT, section tangentielle d'une colonie "dite intacte", x25000.
10. B.1.1., MeT, "unités de ROWLEY" d'une colonie dégradée, x250000.

c = cupule, p = pédoncule, m = mucilage



B.1.2. Les colonies „dites intactes” ont une affinité électronique plus forte; les stries noires qui marquent la phase initiale de la dégradation se répandent partout. La dégradation est avancée, en particulier sur les lamelles du mucilage; les unités globulaires sont bien observables. Il faut remarquer, que la paroi qui à l'origine est compacte, devient lamellaire par suite de la dégradation. Il y a des colonies très dégradées où le MeT, permet d'observer la structure fine originelle complètement désorganisée.

B.2.1. Les colonies „dites intactes” et celles dégradées sont identiques à celles de B.1.2.

B.2.2. Parmi les colonies „intactes” au MePh, nous avons pu observer deux types: B.1.1. et B.1.2.. Sur les coupes ultraminces, des unités globulaires et des „unités de ROWLEY” ont été observées.

B.3.1. Les colonies „intactes” ressemblent à celles de B.1.2., mais rarement à celles de B.1.1.. Les éléments des polymères des colonies dégradées, rappellent celles de B.2.2.

B.3.2. et B.4a.1. sont essentiellement identiques à celles de B.3.1.

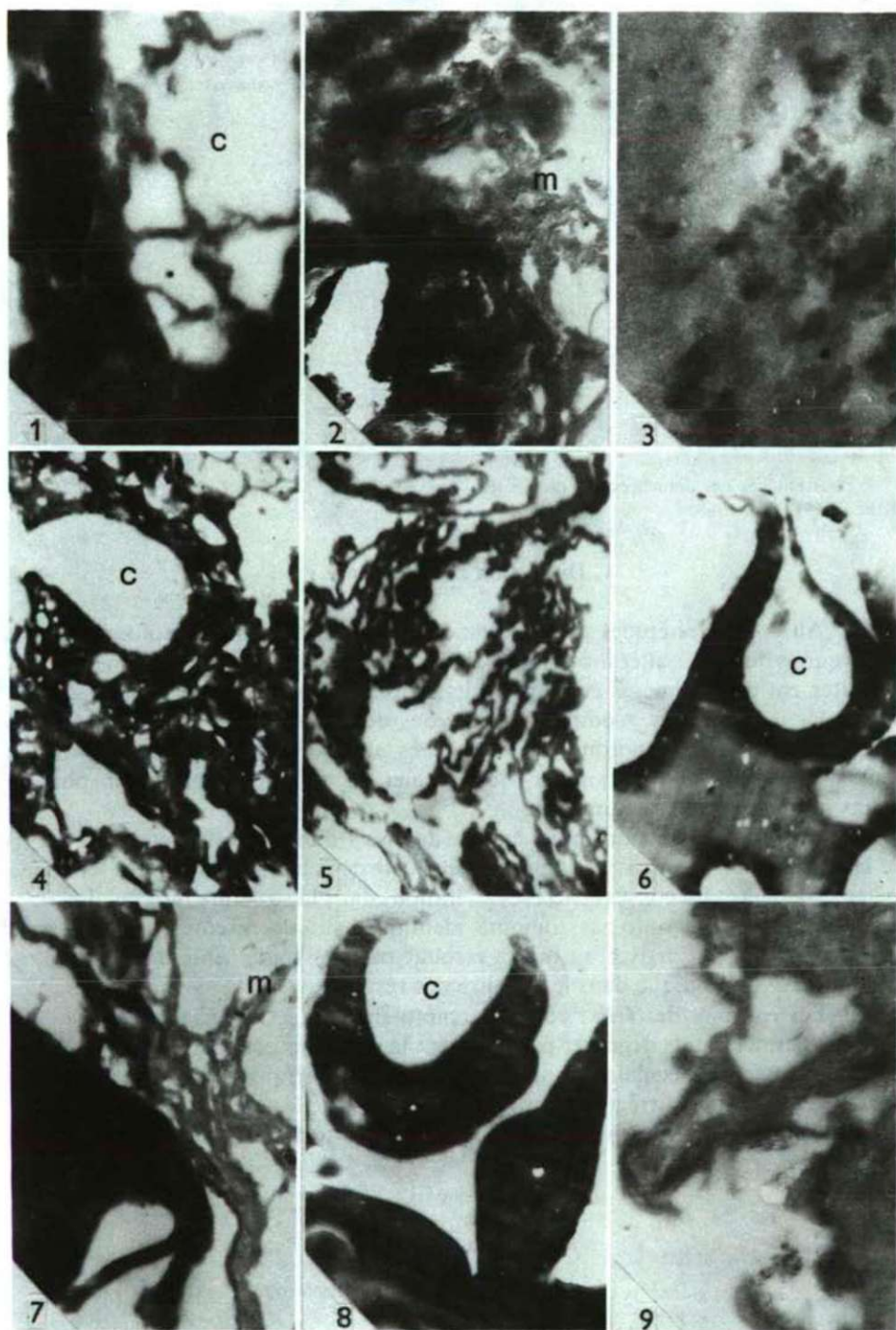
B.4a.2. Parmi les „colonies intactes” on a pu observer les types B.1.1., et B.1.2., mais leur dégradation est en général plus avancée. Il y a beaucoup d'éléments lamellaires et fibrillaires. Les macromolécules sont ici plus visibles. On a mesuré le diamètre des polymères: 7 à 14 Å. Les pourcentages de polymères de différents diamètres sont indiqués sur la fig. 2.. Nous avons ajouté la courbe des pourcentages comparables de *Restioniidites hungaricus*, en se basant sur des recherches antérieures de KEDVES et al. (1974). Les différences entre les deux sorte de microfossile sont remarquables.

Planche II

Botryococcus braunii KÜTZ.

1. B.1.2., MeT, détail d'une cupule partiellement dégradée, au milieu du mucilage; les éléments de l'ultrastructure sont homogénéisés, x25000.
2. B.1.2., MeT, la dégradation est importante mais les éléments du mucilage sont visibles, l'homogénéisation des cupules est nette, x25000.
3. B.1.2., MeT, éléments des „unités de ROWLEY” d'une colonie très dégradée, x100000.
4. B.2.1., MeT, détail de l'ultrastructure d'un colonie presque intact, x5000.
5. B.2.2., MeT, éléments lamellaires d'une colonie partiellement dégradée, 5000.
6. B.3.2., MeT, phase initiale de la dégradation des colonies de type B.1.1., x5000.
7. B.3.2., MeT, éléments du mucilage extérieur et partie d'une cupule, x10000.
8. B.4a.1., MeT, phase initiale de dégradation des colonies de type B.1.2., x5000.
9. B.4a.1., MeT, détail d'une colonie fort dégradée; l'ultrastructure originelle n'est plus observable, x5000.

c = cupule, m = mucilage



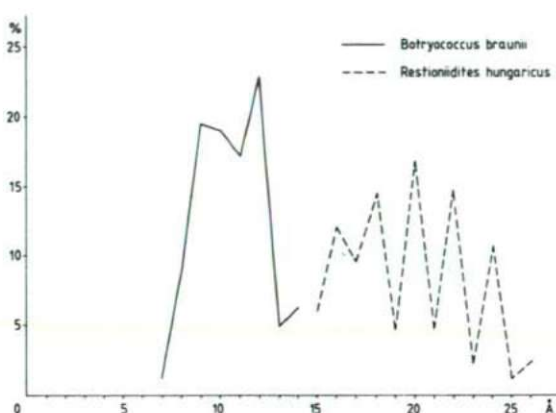


Fig. 2

Pourcentages des diamètres des polymères sphériques de *B. braunii* KÜTZ. et de *R. hungaricus* (KDS. 1965) ELSIK 1968.

Discussion et conclusions

1. Au cours des études de dégradation expérimentale des microfossiles, nous remarquons que, si les altérations moléculaires débutent au cours de la sédimentation, le traitement des sédiments et les produits utilisés pour le MeT peuvent également altérer les microfossiles. Comme nous l'avons déjà fait remarquer (KEDVES 1985) dans certains cas, les sporomorphes observés au MePh sont apparemment bien conservés, mais l'observation au MeT permet de voir une dégradation plus ou moins partielle de la structure fine.

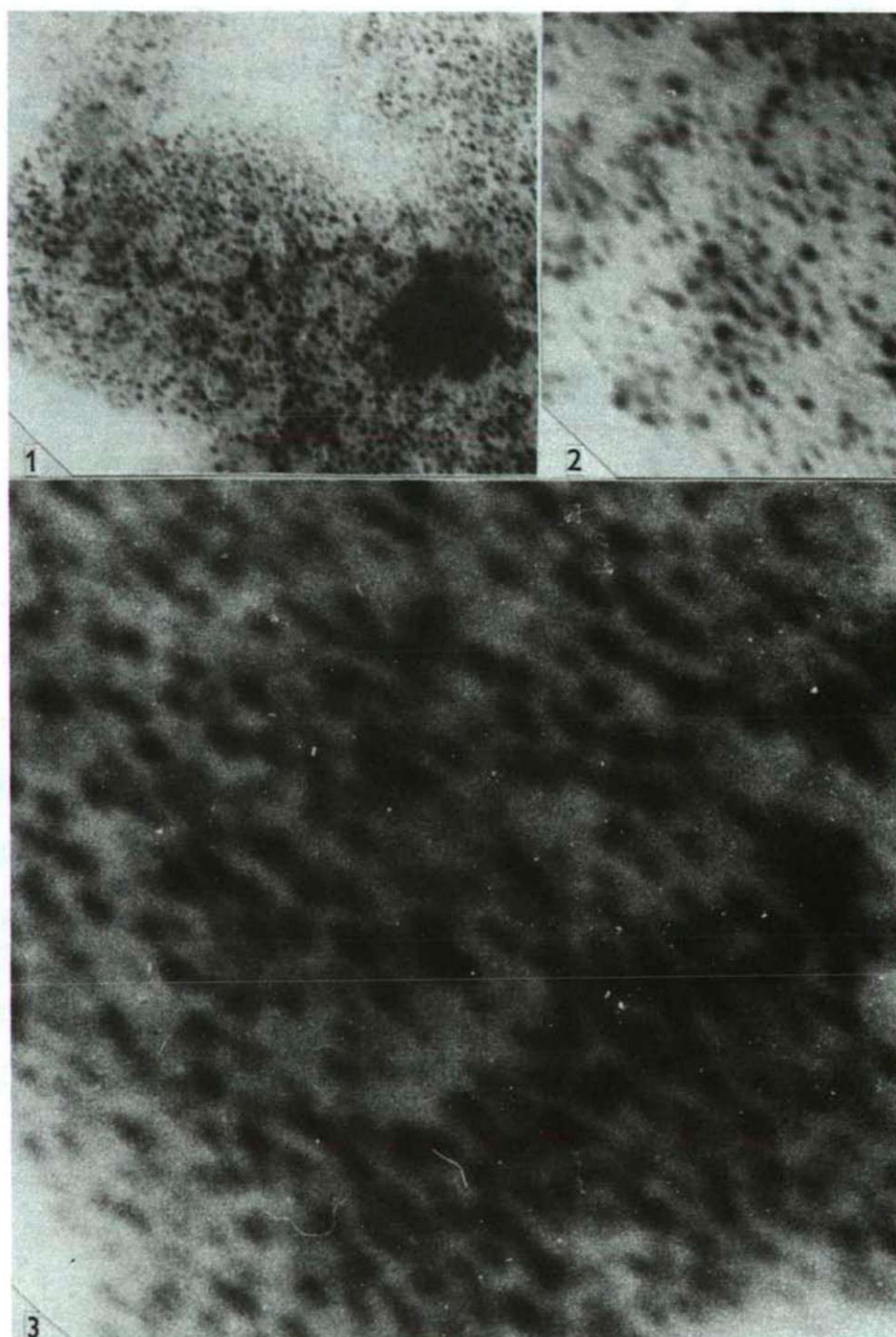
2. Les résultats obtenus indiquent, qu'au cours du traitement l'effet des agents de la dégradation n'est pas toujours le même sur des colonies différentes lors de la même expérience. En conséquence, les altérations dans la structure moléculaire, dues à la fossilisation ne sont pas toujours identiques sur des exemplaires différents. Cependant, on peut arriver au même résultat par des traitements différents, ainsi que nous l'avons indiqué dans le chapitre des résultats.

3. Les enzymes de *Helix*, ou le Mercapto-Ethanol, et le mélange de ces deux produits permettent de dégrader partiellement la paroi des colonies de *Botryococcus*. Les unités macromoléculaires sont globulaires, mais l'arrangement de ces éléments peut être filamenteux, irrégulier, etc. Il est curieux, que le résultat le plus visible ait été obtenu par le traitement B.4a.2., au Mercapto-Ethanol uniquement, sans

Planche III

Botryococcus braunii KÜTZ.

- 1-3. B.4a.2., éléments globuleux des macromolécules à des grossissements différents.
1. x100000, 2. x250000, 3. x500000.



l'enzyme de *Helix*. Il faut mentionner que la paroi compacte peut être lamellaire par suite d'une dégradation partielle (cf. AFZELIUS 1956).

4. Il faut souligner la nécessité de continuer recherches sur les polymères des sporomorphes fossiles. En obtenant ainsi des informations supplémentaires, on peut espérer établir des relations phylétiques de la structure macromoléculaire de la paroi des sporomorphes et des cystes ou d'autres restes organiques.

Remerciements

Le texte français a été corrigé par Mlle M. SCHULER (C.S.G.S., Strasbourg, France). M. le professeur L. FERENCZY m'a donné la possibilité d'effectuer ces expériences à l'Institut de Microbiologie de l'Université J.A. de Szeged et ses conseils m'ont été très utiles. Mmes I. GYURICZA et I. PALÁGYI, et M. I. ROJIK m'ont apporté leur collaboration technique dans la réalisation de ces recherches. Je tiens à leur exprimer mes remerciements les plus sincères.

Bibliographie

- AFZELIUS, B.M. (1956): Electron-microscope investigations into exine stratification. — *Grana Palynologica* 1, 22-37.
- ELSIK, W.C. (1966): Biologic degradation of fossil pollen grains and spores. — *Micropaleontology* 12, 515-518.
- ELSIK, W.C. (1968): Palynology of a Paleocene rockdale lignite, Milam Country, Texas. I. Morphology and Taxonomy. — *Pollen et Spores* 10, 263-314.
- ELSIK, W.C. (1971): Microbial degradation of sporopollenin. In: Sporopollenin (eds. BROOKS, J., GRANT, P.R., MUIR, M., VAN GUZEL, P. and SHAW, G.). — Acad. Press, London — New York, 480-511.
- KEDVES, M. (1965): A new *Restionaceae* pollen type from the Hungarian Lower Tertiary layers. — *Advanc. Frontiers Plant Sci.* 13, 49-54.
- KEDVES, M. (1983): Étude paléobotanique sur les schistes pétrolifères du Tertiaire supérieur de Hongrie. — *Rev. de Micropaléont.* 26, 48-53.
- KEDVES, M. (1985): Structural modification of degraded fossil sporomorphs. — *Micropaleontology* 31, 176-180.
- KEDVES, M. (manuscrit): In vitro destruction of the exine of recent palynomorphs I.
- ROWLEY, J.R. (1967): Fibrils, microtubules and lamellae in pollen grains. — *Rev. Palaeobotan. Palynol.* 3, 213-226.
- ROWLEY, J.R. (1975): Lipopolysaccharide filaments within the exine of pollen grains. — 33rd Ann. Proc. Electron Microscopy Soc. Amer., 572, 573.
- ROWLEY, J.R. (1978): The origin, ontogeny, and evolution of the exine. — IV Int. Palynol. Conf., Lucknow (1976-77) 1, 126-136.
- ROWLEY, J.R., DAHL, A.O., SENGUPTA, S. and ROWLEY, J.S. (1981): A model of exine substructure based on dissection of pollen and spore exines. — *Palynology* 5, 107-152.
- SENGUPTA, S. and ROWLEY, J.R. (1974): Re-exposure of tapes at high temperature and pressure in the *Lycopodium clavatum* spore exine. — *Grana* 14, 143-151.

Adresse de l'auteur:
M. KEDVES
Institut botanique
de l'Université
Attila József
H-6701 Szeged
Boite Postal 657
Hongrie